

⑫ 公開特許公報(A)

平3-293556

⑬ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)12月25日

G 01 N 27/416
27/3276923-2J
7235-2JG 01 N 27/46
27/303 3 6 Z
3 5 3 F

審査請求 有 請求項の数 1 (全9頁)

⑮ 発明の名称 生体機能物質固定化電極を用いた分析法

⑯ 特 願 平2-93991

⑰ 出 願 平2(1990)4月11日

⑱ 発 明 者 山 内 繁 東京都千代田区一番町22-7-205
 ⑱ 発 明 者 碓 山 義 人 東京都目黒区大岡山2-10-36 CB-3
 ⑱ 発 明 者 矢 尾 板 仁 埼玉県所沢市花園2-2341-33
 ⑲ 出 願 人 国立身体障害者リハビリテーションセンター
 総長

明 細 書

1. 発明の名称

生体機能物質固定化電極を用いた分析法

2. 特許請求の範囲

生体機能物質を固定化した電極を用いて電気化学的弁定常法により測定対象物質の検出または濃度の決定を行なうシステムにおいて、測定パルスに先立つ予備パルスによる電気化学的な処理と一定時間の開回路状態を保つことを特徴とする分析方法。

3. 発明の詳細な説明

「発明の目的」

「産業上の利用分野」

この発明は、生体機能物質の分子識別機能を利用して生体物質を検知するバイオセンサによる分析方法に関するものである。特に、生体機能物質

を多孔性電極に直接包括固定化して作製した固定化電極を用いた、再現性ならびに信頼性に優れた微量試料に対する迅速分析法に関するものである。

【従来の技術】

本発明者らは、すでに白金黒表面への生体機能物質の包括固定化が可能であることを見出し、これを利用した固定化電極を作製することに成功し、特許出願した(昭和62年特許願 第55387号 及び 第56472号)。さらに、固定化電極を用い、静止した微量サンプルの測定が可能な分析システムとこれを用いた電気化学的弁定常法に基づく分析法を開発し、特許出願した(昭和62年特許願 第304523号)。

この方法は、試料溶液の採取量を厳密に規定する必要がなく、微量の静止試料の測定や無希釈測定が可能であり、ミリ秒オーダーでの迅速測定を特徴とする点で、バイオセンサの応用範囲の可能性を大きく広げたものであった。しかし、事前に測定対象物質を含まない緩衝溶液(以下ブランク溶液と呼ぶ)でのブランク測定を行い、その値を

目的の試料溶液に対する応答から差し引く必要があり、その操作が煩雑となる。このため、この方法はミリ秒オーダーでの応答を利用した迅速分析法でありながら、試料溶液測定前の操作も含めた測定操作全体では、その利点を十分に発揮することができなかった。

〔発明が解決しようとする問題点〕

白金電極上に酵素を包括固定化した酵素電極に電気化学的非常法を適用して定電位単純パルスに対する非常応答電流を記録したとき、その応答電流は実施例2に示すごとくブランク溶液に対してもゼロとはならない。この非常電流は、パルス印加直後の電気二重層容量の充電電流の他に、不純物分子や電極表面の電気化学的酸化還元反応に由来するファラデー電流を含んでいる。このため、検体試料に対して観測された非常電流値から、ブランク溶液について観測された非常電流値を差し引く必要がある。また、このブランク溶液に対する応答が検体試料に対する応答電流に比して無視し得るほど小さくない場合には、セ

ンサ応答の再現性、信頼性も損なわれる。そこで、この発明はブランク溶液に関する応答の測定、所謂ブランク測定を必要としない分析方法を提供しようとするものであり、これによって再現性良く、信頼性に優れた迅速分析方法を提供するものである。

〔発明の構成〕

〔問題点を解決するための手段〕

この発明は、上記の問題点を解決するために、測定パルスを加える直前に予備パルスを印加し、電気化学的な前処理によって測定対象物質に由来しない応答を低減せしめ、その後一定時間開回路状態を保った後、引きつづく測定パルスによってセンサ応答の測定を行なうことを特徴とする分析方法を提供する。

この発明において利用する生体機能物質を包括固定化した電極ならびに分析システムは、出願特許（昭和62年特許願 第304523号）に述べられている非常応答を用いた分析システムで

ある。すなわち、昭和62年特許願第55387号、56472号に述べられているように、白金などの微粒子から構成された微小電極の表面に酵素などの生体機能物質を包括固定化した導電性微粒子層を有する構造の電極を作用電極とし、銀・塩化銀などの参照電極ならびに対極を備えた三電極を有する電気化学システムであり、その構造の一例を第一図に示す。第一図において、作用電極1は生体機能物質（例えばグルコース酸化酵素）を包括固定化した微小電極であり、直径が例えば、約 $1\mu\text{m}$ ～ $500\mu\text{m}$ の範囲の微小電極である。これに白金製の対極2と銀・塩化銀系の参照電極3とをもって構成したものがセンサ素子6である。以上の三電極、すなわち、微小固定化電極1、対極2と参照電極3は、テフロン型棒5の穴の中にポリエステル樹脂4で包埋されたものである。このようなセンサ素子6は、細い金属線を3本封入固定しただけの構造であるから、微細加工技術を用いれば、これら全体を非常に微小なセンサに構成することもできる。

このセンサ素子を用いれば、例えば $1\mu\text{m}$ 程度の微量試料でも測定可能である。即ち、微量試料を滴下した後に電位を印加し、このときに発生する電流値を検知する方式によって、微量試料中の物質を検知できるものである。

上に述べた分析システムを用いて、定電位パルスに対する非常電流応答を記録してセンサ応答を得るが、単純パルスに対する応答では、測定対象物質を含まない溶液に対しても、実施例2に示すように無視し得ないほどのファラデー電流が観測される。従来、ブランク測定が必要とされたのは、この電流を差し引く必要があったためである。

この発明は、第2図に示すように、測定用の定電位パルス9を印加する直前に、予備的な定電位パルス7を印加し、一定時間開回路状態8に保った後、測定用パルス9を印加することによって上記問題点を解決せんとするものである。

〔作用〕

電気化学系に定電位パルスを印加したときに観測される非常電流応答は、一般に、電気二重層

容量の充電に由来する容量性電流と電極における電気化学的酸化還元反応に由来するいわゆるファラデー電流の二つの成分より成っている。容量性電流は数十マイクロ秒から数百マイクロ秒の時定数で減衰してしまうので、この発明で問題とする数ミリ秒から数十ミリ秒程度の非定常電流において問題となるのはファラデー電流のみであると考えて良い。

ブランク溶液に対するファラデー電流は、主として、溶液中に含まれる不純物の電極反応ならびに電極表面の電気化学的酸化還元反応からなっていると考えることができる。以下の説明並びに実施例において、グルコース検知に適用した場合を例として述べる。この場合、電極表面に固定化したグルコース酸化酵素の作用によってグルコースが酸化されるが、この際生成した過酸化水素を電気化学的に酸化するに要する電流を検出することによってグルコースを検出しようとするものである。従って、以下の記述においては予備パルス、測定パルスともに酸化パルスを用いているが、生

体機能物質と測定対象物質との組み合わせによっては、還元パルスを印加すべき場合もある。

銀・塩化銀参照電極に対して0.6Vの定電位パルスを印加したときに観測される酸化電流は、過酸化水素の酸化電流の他に、電極近傍の還元性不純物の酸化電流および白金黒表面を酸化して表面酸化物を生成する酸化電流を含む可能性がある。ブランク溶液において観測される非定常電流は主として還元性不純物の酸化電流ならびに白金黒表面の酸化電流に由来すると考えられる。従って、測定パルスに先立つ予備パルスの印加によって、ブランク溶液に対しては、電極表面近傍に存在した還元性不純物を酸化し、白金黒表面の酸化状態を、測定用パルスを印加した場合と同じ状態に調整する効果があるために、ブランク溶液の応答を無視しうるほど小さくすることができる。

グルコースを含む試料溶液に対しては、既に生成していた過酸化水素も予備パルスによって同様に酸化されるが、8の閉回路状態の期間にグルコースの反応によって再び過酸化水素が生成するの

で、このとき発生した過酸化水素を測定パルスによって検出することになる。

〔実施例〕

実施例1 センサ素子の作製

第一図に示したセンサは以下の手順によって作製した。テフロン型枠5の中に、1 μ m~500 μ m径の範囲の微小白金線、200 μ m径の対極用の白金線、そして500 μ m~1mm径程度の銀線をそれぞれ1本ずつポリエステル樹脂4で封入した後に、アルミナ研磨剤で研磨した。白金作用電極表面に対する酵素の固定化は次の方法で行なった。

300ppmの酢酸鉛含有の3%塩化白金酸溶液の中で、銀・塩化銀参照電極に対し、-0.1Vの電位で5分間定電位電解して白金黒の電析析出を行い、厚さ約数 μ mの白金黒を得た。次に、得られた白金黒析出電極を室温で60秒間乾燥した後に、0.5M硫酸水溶液中で-0.3Vに30分間保持し、白金黒電極から水素を発生させた。60秒間風乾した後に、1.2Vの一定電位を1

5分間印加し、電極表面の酸化処理を行なった後、5500単位のグルコース酸化酵素含有磷酸緩衝液(pH 6.8)1mlに30分間浸漬し、再度風乾した。

次に、以上のようにして得られた微小電極を有するセンサ素子6において、銀線を銀・塩化銀参照電極とした。このようにして作製した三電極よりなるセンサ素子6を、0.1M磷酸緩衝液中で一昼夜攪拌、洗浄し、この発明に用いる三電極系センサ素子を得た。

実施例2 単純パルスを用いたグルコース濃度の測定

グルコース濃度の測定にあたっては、第3図に示した測定系を用いた。即ち、センサ素子6の作用電極1、対極2、参照電極3をそれぞれポテンシオスタット10に結線し、パルスの印加は、ファンクションジェネレータ11からの信号によってポテンシオスタットを駆動せしめた。非定常電流は、ディジタルメモリスコープ12に記録した。直径50 μ mの白金線を用いて作製した固定化酵

素電極を作用極とし、銀・塩化銀参照電極に対して0.6Vの単定電位パルス印加したときの非定常電流応答を第4図に示す。曲線13は20mMのグルコースを含む燐酸緩衝液に対する応答であり、14は燐酸緩衝液のみのブランク溶液に対する応答であって、15は20mMフルクトースを含む燐酸緩衝液に対する応答である。

いずれの応答も、1ミリ秒程度で二重層容量の充電によると思われる初期のピーク電流は減衰し、2ミリ秒以降はファラデー電流が観測されていると思われる。フルクトース溶液がブランク溶液とほぼ同一の曲線を与えていることから、曲線13と14との差は、20mMの濃度のグルコースの存在によって生成した過酸化水素を、電気化学的に酸化するに際して流れた電流に由来するものと考えられる。そこで、2ミリ秒後のグルコース溶液とブランク溶液との電流応答の差をセンサ応答と定義し、種々の濃度におけるセンサ応答を測定した。この結果を第5図に示すが、センサ応答は濃度に対して一線的に対応しており、この応答か

らグルコース濃度を知ることができる。しかしながら、第4図に示したデータを再現性良く得るためには、センサと溶液とが接触してから測定開始までの時間を一定に保たねばならず、また、ブランク溶液に対する応答もその都度測定することが必要であった。

実施例3 予備パルスを用いたグルコース濃度の測定

実施例2と同じ装置を用い、第2図に示した予備パルス7を与えた後、一定時間開回路状態8に保持し、その後測定パルス9による測定を行なった。銀・塩化銀参照電極に対して0.6Vの定電位予備パルスを60秒間与えた後、10秒間開回路状態に保ち、引き続いて同じく0.6Vの定電位測定パルスを印加して得られた非定常電流応答を第6図に示す。曲線16は、5mMグルコースに対する応答であり、17はブランク溶液に対する応答である。

ブランク溶液に対する応答は、5ミリ秒程度で1.5 μ A程度であって、10ミリ秒以降はグル

コース溶液に対する応答電流に比較して無視できるほど小さい。即ち、予備パルスを用いた場合には、ブランク溶液の応答は非常に小さいので、ブランク溶液に対する応答をそのつど測定して電流値を差し引き操作は必要ない。

実施例4 センサ応答のグルコース濃度依存

実施例3で得られた非定常電流応答からグルコース濃度を定めるために、測定パルス印加後一定時間における電流値とグルコース濃度との関係を求めた。

種々のグルコース濃度の試料溶液に対して、実施例3と同様に予備パルスを20秒間印加した後、10秒間開回路状態に保ち、その後定電位測定パルスに対する非定常電流の測定を行い、10ミリ秒後の電流値をセンサ応答として、そのグルコース濃度依存を測定した結果を第7図に示す。グルコース濃度0.1Mから10mMまでの間で良い直線性を示しており、予備パルスを用いることによってブランク溶液に対する応答の測定なしに、測定パルスに対する非定常電流値からグルコース

濃度を直接定めることができることを示している。

実施例5 パルス印加時間とセンサ応答

実施例2と同じ装置を用いて、実施例3、4と同じ電位条件にて、第2図におけるパルス印加時間とセンサ応答の関連について調べた。予備パルス印加時間を1秒から60秒まで変化させ、10秒間開回路状態に保った後に測定した10ミリ秒後の非定常電流値を第8図に示す。曲線18は5mMグルコースを含む燐酸緩衝液に対する応答を、19はブランク溶液に対する応答を示す。

ブランク溶液に対する応答は、予備パルス15秒程度まで急速に減少し、十分に減衰するには60秒程度を必要とする。一方、グルコースに対する応答は、30秒程度ではほぼ一定値をとる。

一方、開回路時間とセンサ応答との関係を知るために、予備パルス時間を20秒に保ち、開回路時間を1秒から30秒へと変化させたときの、10ミリ秒後の非定常電流値で定義したセンサ応答を調べた結果を第9図に示す。曲線20、21、22はそれぞれ10mM、5mM、2mMグルコ

ース溶液に対する応答である。この結果から開回路状態においては、主としてグルコース酸化酵素によるグルコースの酸化反応が進行し、電極表面において過酸化水素の生成が進行するものと考えられる。

以上の結果をまとめると、予備パルス時間の長い程ブランク溶液の与える応答は小さく、開回路時間の長い程センサ応答は大きくなることがわかる。一方、実用上の見地に立てば、これらの時間の短い方が迅速分析には有利である。そこで、予備パルス5秒、開回路時間5秒の条件で種々の濃度のグルコース溶液に対するセンサ応答の測定を行なった結果を第10図に示す。

グルコース濃度ゼロ、即ち、ブランク溶液に対する応答はゼロとはならないが、それぞれのグルコース濃度に対して再現性の良いセンサ応答が得られており、予備パルスを与えた場合、ブランク溶液に対する応答が完全にゼロとなるまで待たない場合にも再現性の良い測定が可能である場合があり、必要に応じて、この条件によって測定の迅

速化をはかることも可能であることを示している。

実施例6 応答の再現性の検討

予備パルスの印加による再現性の向上を検討するために、予備パルスを用いた場合と単純パルスを用いた場合とについてセンサ応答を繰り返し測定した。測定装置は実施例2と同じであり、10 mMグルコース溶液を試料とし、予備パルス時間は20秒、開回路時間は30秒であった。結果の一例を第11図に示す。

第11図の白丸は予備パルスを用いない単純パルスの場合のセンサ応答であり、黒丸が上記予備パルスを用いた結果である。

単純パルスの場合、第1回目の応答は常に異常に大きい値を与え、第2回目以降についても標準偏差3%程度のばらつきが観測された。一方、予備パルスを用いた場合、再現性は向上し、標準偏差は0.4%程度となった。

[発明の効果]

電気化学的弁定常法を酵素包括電極に適用し、生体物質の検知に利用することは、センサ応答が

試料量に依存しない迅速分析法を確立するための道を拓いたものであったが、ブランク測定を要する等簡便さに難があり、糖尿病性網膜症患者等の血糖値の自己管理等に利用するためのセンサ素子としてはそのままで実用化するには困難があった。この発明による予備パルスと開回路状態との併用によって、実施例3、4、5に示した如く操作は著しく簡便化することが可能となり、かつ、実施例6に示した如く信頼性は著しく向上した。

以上要するに、この発明の技術的効果は、微量試料に対して、簡便、かつ、信頼性の高い高感度迅速分析を可能とする点にある。

4、図面の簡単な説明

第1図は、この発明において利用するセンサ素子の構成例である。

第2図は、この発明において用いる予備パルス及び開回路状態のプログラムの一例である。

第3図は、実施例2～実施例6において用いた測定系の概念図である。

第4図は、定電位単純パルスを印加したときの弁定常電流応答の例である。

第5図は、定電位単純パルスに対する弁定常電流応答を用いて得られたセンサ応答のグルコース濃度に対する依存を表わす。

第6図は、予備パルスを用いた時の弁定常電流応答の例である。

第7図は、予備パルスを用いた時の弁定常電流応答から得られたセンサ応答のグルコース濃度依存を表わす。

第8図は、センサ応答の予備パルス時間に対する依存を表わす。

第9図は、開回路状態の時間に対するセンサ応答の依存を表わす。

第10図は、予備パルス、開回路状態ともに5秒間としたときのセンサ応答を表わす。

第11図は、単純定電位パルスに対する応答から得られたセンサ応答と予備パルスを用いた場合のセンサ応答の再現性を比較したものである。

〔主要な部分の符号の説明〕

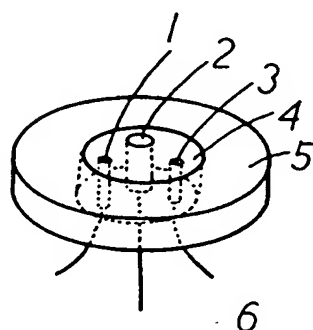
- 1・・・生体機能物質固定化電極
- 2・・・対極
- 3・・・銀・塩化銀参照電極
- 4・・・ポリエステル樹脂樹脂
- 5・・・テフロン型枠
- 6・・・センサ素子
- 7・・・予備パルス
- 8・・・測定期間
- 9・・・定電位測定パルス
- 10・・・ポテンシオスタット
- 11・・・ファンクションジェネレーター
- 12・・・デジタルメモリースコープ
- 13・・・20 mM グルコースに対する応答
- 14・・・ブランク溶液に対する応答
- 15・・・20 mM フルクトース溶液に対する応答
- 16・・・5 mM グルコースに対する応答
- 17・・・ブランク溶液に対する応答
- 18・・・5 mM グルコースに対する応答
- 19・・・ブランク溶液に対する応答

20・・・10 mM グルコースに対する応答

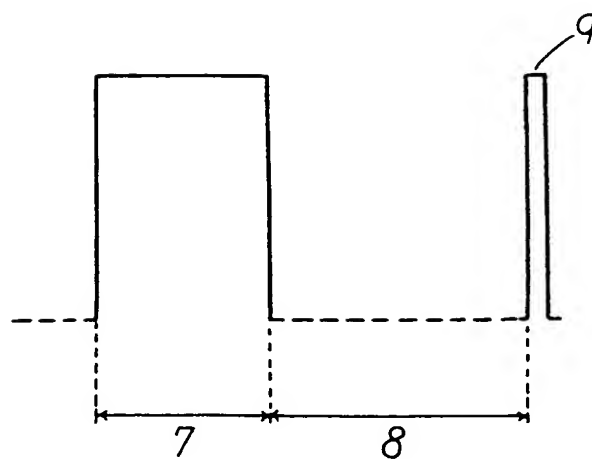
21・・・5 mM グルコースに対する応答

22・・・2 mM グルコースに対する応答

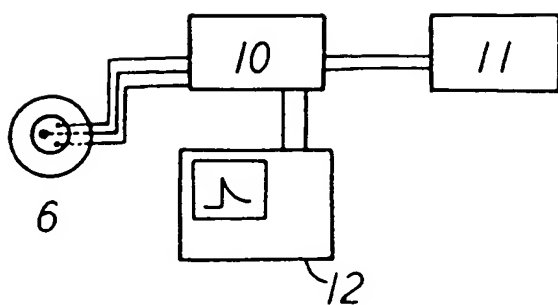
特許出願人 国立身体障害者リハビリテーション
センター



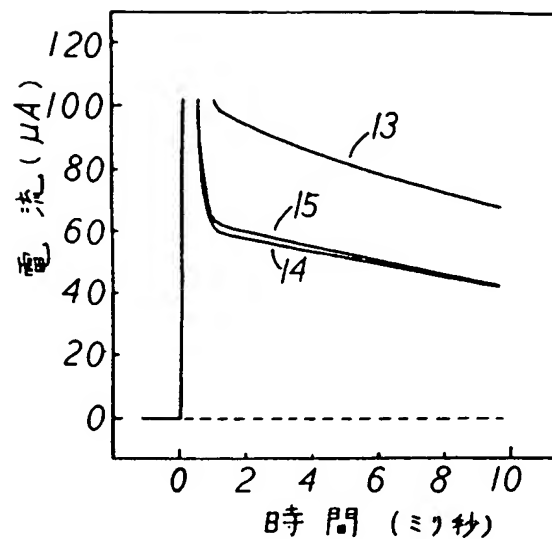
第 1 図



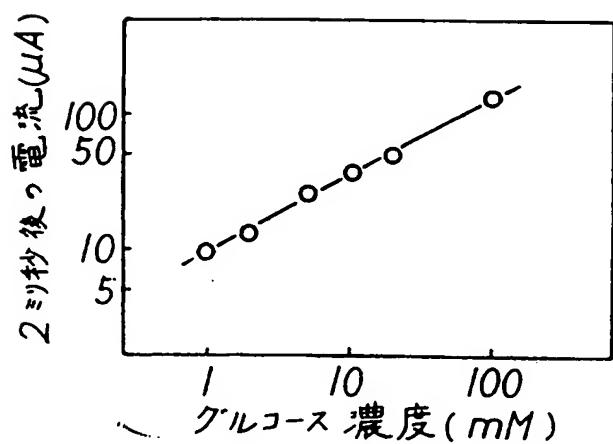
第 2 図



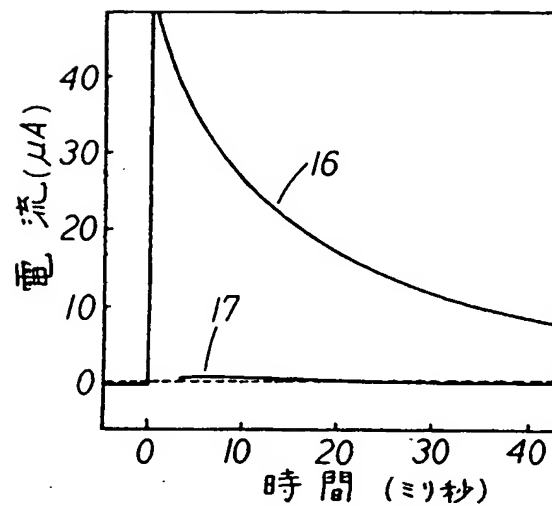
第 3 図



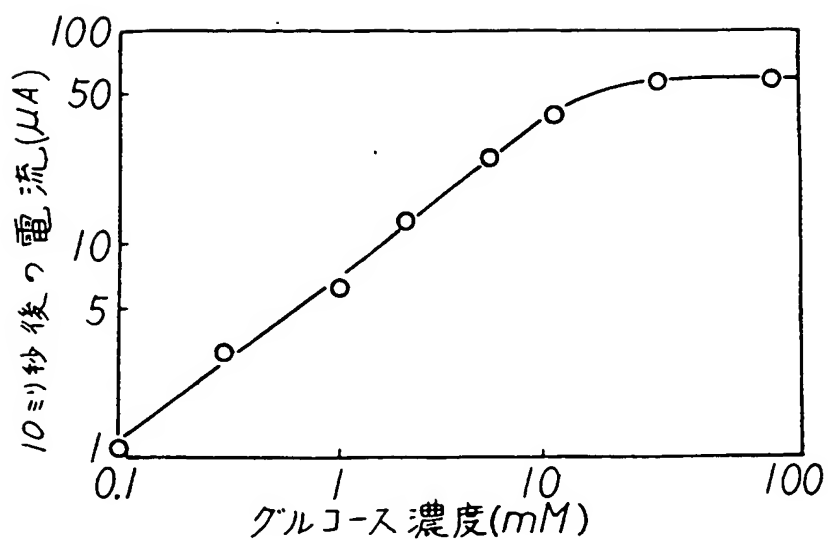
第 4 図



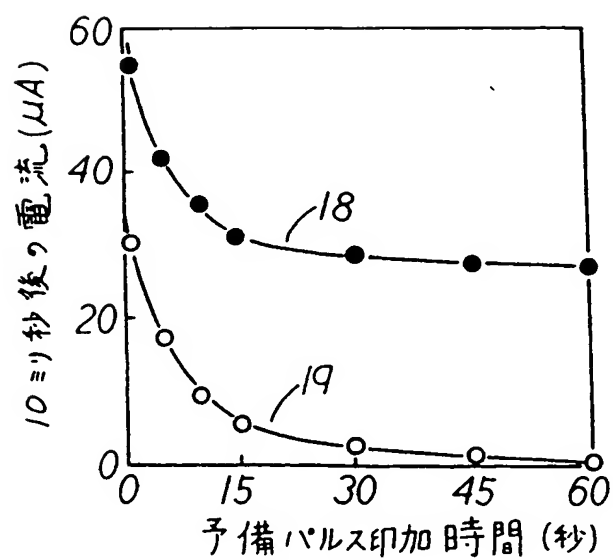
第 5 図



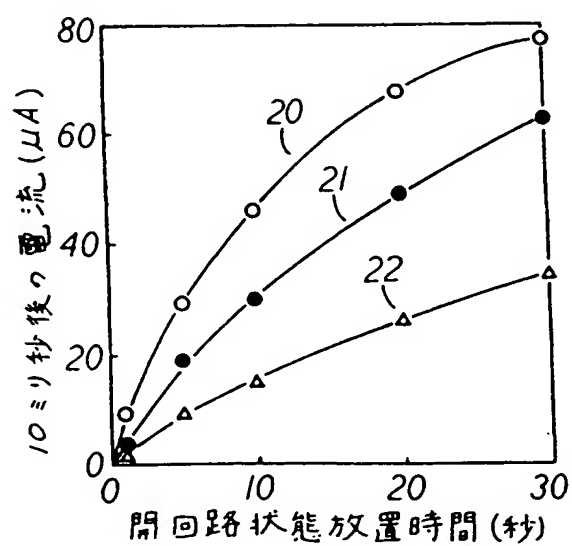
第 6 図



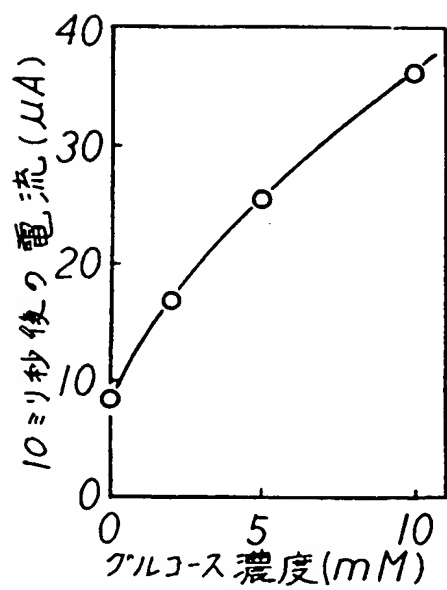
第 7 図



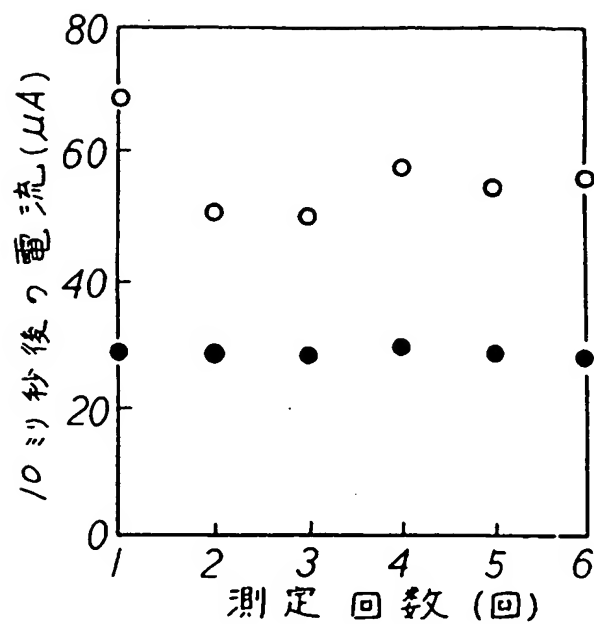
第 8 図



第 9 図



第 10 図



第 11 図